

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-175990

(43)公開日 平成8年(1996)7月9日

(51) Int.Cl. <sup>*</sup> A 61 K 31/235 31/71 C 07 C 69/84	識別記号 ADU ABE ABX AED	序内整理番号 9546-4H	F I	技術表示箇所
---	----------------------------------	-------------------	-----	--------

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全7頁) 最終頁に統く

(21)出願番号 特願平6-314995	(71)出願人 000005968 三菱化学株式会社 東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
(22)出願日 平成6年(1994)12月19日	(72)発明者 小河原 宏 東京都文京区湯島2丁目33番9号
	(72)発明者 東 勝一郎 神奈川県川崎市高津区二子84番
	(72)発明者 高嶋 純子 神奈川県横浜市青葉区鶴志町1000番地三 菱化学株式会社横浜総合研究所内
	(74)代理人 弁理士 遠山 効 (外2名)

最終頁に統く

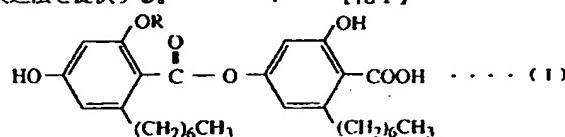
(54)【発明の名称】 P I 3 キナーゼ阻害剤とその製造法

(57)【要約】

【目的】 低濃度でP I 3 キナーゼ阻害作用を示すP I 3 キナーゼ阻害剤及びその製造法を提供する。

\* 【構成】 下記一般式(I)で表わされるジテブシドを、P I 3 キナーゼ阻害剤の有効成分とする。

\* 【化1】



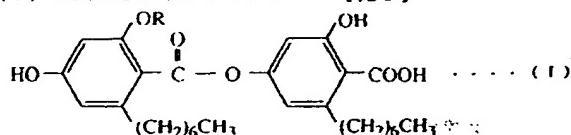
但し、上記一般式(I)中、Rは水素原子、β-D-グルコピラノシリル基またはβ-D-ガラクトピラノシリル基

を表わす。

BEST AVAILABLE COPY

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式(1)で表わされるジテブシド



但し、上記一般式(1)中、Rは水素原子、 $\beta$ -D-グルコビラノシリル基または $\beta$ -D-ガラクトビラノシリル基を表わす。

【請求項2】 前記一般式(1)で表されるジテブシドを産生する微生物を適当な培地で培養して、培養物中にジテブシドを生成蓄積せしめ、その培養物からジテブシドを採取するジテブシドの製造法において、ジテブシドを産生する微生物として不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌D2949株(FERM P-14711)を用いることを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はジテブシドを有効成分とするP13キナーゼ阻害剤に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、 fosfathialenine (P1) のイノシトール環のD-3の位置をリン酸化するP13キナーゼ (Nature, 315, 239-242 (1985); Nature, 332, 644-646 (1988)) が、多くの増殖因子受容体や癌遺伝子産物と直接的な関連を持つことで注目されている。

【0003】P13キナーゼはこれまでとは異なるP1代謝経路をとり、チロシンキナーゼを介して細胞増殖や癌化に重要な役割を果していることが明らかになってきた。したがってP13キナーゼの阻害剤は新しいタイプの抗腫瘍剤となることが期待される。

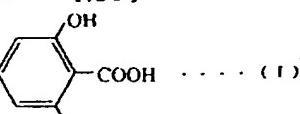
【0004】癌の化学療法の分野においては多くの化学物質が医薬品として実用化されているが、多くの場合葉効が不十分なだけでなく、これらの薬剤に対する腫瘍細胞の耐性の問題も臨床での使用法を複雑にしている。

〔第47回日本癌学会総会記事、12頁～15頁(1988年)参照〕。このような状況下、癌治療の分野においては常に新規な抗腫瘍性物質の開発が求められている。

【0005】また、従来の抗腫瘍性物質はその作用機序が細胞の分裂増殖の基本機構に対する抑制作用に基づいていることから、その作用は癌細胞のみに限定されるも※

【特許請求の範囲】 \*ドを有効成分とするP13キナーゼ阻害剤。

【化1】



※のではなく、正常細胞にも非特異的な細胞毒作用を与える、結果として薬物投与時に副作用をもたらすことが臨床上の大きな問題となっており、必ずしも満足すべき状況ではない。従って、癌細胞特異的に作用し、正常細胞に対して副作用を持たない抗腫瘍剤の登場が望まれている。

【0006】さらに、P13キナーゼは好中球、血小板の活性化にも深く関与している。したがってP13キナーゼ阻害剤は好中球、血小板の活性化を抑えることにより、新しいメカニズムの抗炎症剤や抗動脈硬化剤となることが期待される。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、常に要求されているところの、新規な抗腫瘍剤、抗炎症剤あるいは抗動脈硬化剤としての利用が期待される、P13キナーゼ阻害剤及びその製造法を提供することにより、これらの問題点を解決しようとするものである。

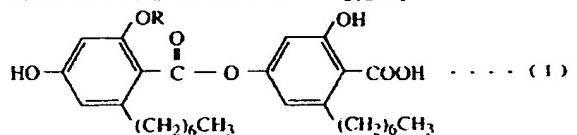
【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、微生物が抗生物質などの生理活性物質を生産することに着目し、自然界より多数の試料を採取して、それらから分離された多種類の培養物について検討を重ねた結果、不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌の培養物中に、P13キナーゼ阻害作用を有する物質が含有されていることを見出し、その物質の構造を明らかにし、本発明を完成するに至った。

【0009】すなわち本発明の要旨は、下記一般式(1)で表わされるジテブシドを有効成分とするP13キナーゼ阻害剤、及び下記一般式(1)で表されるジテブシドを産生する微生物を適当な培地で培養して、培養物中にジテブシドを生成蓄積せしめ、その培養物からジテブシドを採取するジテブシドの製造法において、ジテブシドを産生する微生物として不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌D2949株(FERM P-14711)を用いることを特徴とする方法に存する。

【0010】

【化2】



【0011】但し、上記一般式(1)中、Rは水素原

子、 $\beta$ -D-グルコビラノシリル基または $\beta$ -D-ガラク

トビラノシリ基を表わす。

【0012】以下本発明を詳細に説明する。

<1>本発明のP13キナーゼ阻害剤

本発明のP13キナーゼ阻害剤は、上記一般式(1)で表わされるジテブシド(以下、単に「ジテブシド」という。)を有効成分として含有する。このジテブシドは、環状アチノシン-3', 5'-モノリン酸ホスホジエストラーゼ阻害活性を有する化合物として特公平5-1777号公報に開示されている。

【0013】しかしながら、これらの化合物がP13キナーゼ阻害作用を有することについては全く知らない。本発明は、このジテブシドがP13キナーゼ阻害作用を有することを初めて見出し、その知見に基づいてなされたものである。尚、このジテブシドの物理化学的性質及びP13キナーゼ阻害作用は、後記実施例に示した。また、本発明に用いるジテブシドの入手方法は後述する。

【0014】本発明のP13キナーゼ阻害剤は、これを医薬として用いるに当たり、通常の製剤担体とともに投与経路に応じた製剤とする事ができる。例えば、経口投与では錠剤、カプセル剤、顆粒剤、散剤、液剤等の形態に調剤される。経口投与用固形製剤を調製するに当たり、慣用の賦形剤、結合剤、滑沢剤、その他着色剤、崩壊剤等を用いることができる。

【0015】賦形剤としては、例えば、乳糖、デンプン、タルク、ステアリン酸マグネシウム、結晶セルロース、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、グリセリン、アルギン酸ナトリウム、アラビアゴム等が挙げられ、結合剤としてはポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、エチルセルロース、アラビアゴム、シエラック、白糖等が挙げられ、滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、タルク等が挙げられる。その他、着色剤、崩壊剤も通常公知のものを用いることができる。

【0016】尚、錠剤は周知の方法によりコーティングしてもよい。また液状製剤は水性または油性の懸濁液、溶液、シロップ、エリキシル剤、その他であってもよく、通常用いられる方法にて調製される。注射剤を調製する場合はジテブシドにpH調整剤、緩衝剤、安定化剤、等張剤、局所麻酔剤等を添加し、常法により皮下、筋肉内、静脈内用注射剤を製造することができる。また、坐剤を製造する際の基剤としては、例えばカカオ脂、ポリエチレングリコール、ラノリン、脂肪酸トリグリセライド、ウイテブゾール(ダイナマイトイノーベル社の登録商標)等の油脂性基剤を用いることができる。

【0017】さらに、本発明のジテブシド以外のP13キナーゼ阻害剤を併用してもよいが、他のP13キナーゼ阻害剤との併用は本発明に必須ではない。かくして調製される製剤は、各種癌あるいは腫瘍、各種炎症、動脈硬化症等に対して治療効果が期待される。投与量としては、患者の症状、体重、年齢等によって異なり、一様に

服用することは出来ないが、ジテブシドの量として、通常成人1日当たり約10~2000mgの範囲が好ましく、これを通常1日1~4回に分けて投与するのが望ましい。

【0018】<2>本発明に用いるジテブシドの入手法  
本発明に用いる上記ジテブシドは、例えば、これを產生する微生物を適当な培地で培養し、その培養物、すなわち菌体及び/又は培養上清から、ジテブシドを単離することによって、もしくは得られたジテブシドを化学的修飾することによって得られる。かかる微生物としては、不完全糸状菌綱に分類されるカビ類等が挙げられ、具体的には後述する不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌(シンネマータス・ファンジャイ: *Synnematous fung i*) D2949株が挙げられる。

【0019】以下に、上記微生物の培養、ジテブシドの単離、精製について詳しく述べる。

#### 【0020】(1) 培養

本発明においては、例えば不完全糸状菌綱に分類され、ジテブシドを产生する微生物を、通常の微生物が利用し得る栄養物を含有する培地で培養する。炭素源としては、グルコース、水アメ、デキストリン、シュクロース、デンプン、糖蜜、動・植物油等を使用できる。また窒素源としては、大豆粉、小麦胚芽、コーンスティーブ・リカ、綿実柏、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ、尿素等を使用できる。その他必要に応じて、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硝酸およびその他のイオンを生成することができる無機塩類を培地に添加することは有効である。また菌の生育を助けジテブシドの生産を促進するような有機および無機物を培地に適宜添加することができる。

【0021】培養法としては、好気的条件下での培養法、特に寒天培地等を用いた固体培養法及び液体培地を用いた深部培養法が最も適している。培養に適当な温度は15~30°Cであるが、多くの場合、20~27°C付近で培養する。ジテブシドの生産は、培地や培養条件により異なるがフラスコ内の固体培養法である寒天培地表面培養法では、通常7~21日の間、その蓄積が最高に達する。培養物中のジテブシドの蓄積量が最高になった時に培養を停止し、培養物からジテブシドを単離精製する。

#### 【0022】(2) 化学的修飾

本発明に用いるジテブシドは、例えば培養物から得られたジテブシドを化学的修飾することによって得られる。

【0023】例えば本発明のジテブシド中、グリコシド結合を有するものを酸性条件下、加溶媒分解することによって得ることができる。グリコシド結合を有するジテブシドを例えば、水、エタノール、メタノールなどの極性溶媒中、適当な濃度の硫酸、塩酸などを作用させて、

グリコシド結合脱離ジテブシドに導き、反応混合物からグリコシド結合脱離ジテブシドを単離精製する。

【0024】(3) ジテブシドの単離、精製

本発明に用いるジテブシドは、脂溶性物質であるので、培養物または修飾反応混合物から単離精製するにあたっては、この特性を利用して行うことができる。すなわち、例えば酢酸エチル、クロロルホルム等による溶媒抽出法；シリカゲル、アルミナ、ODS、ダイヤイオンHP-20（三菱化学（株）製）等の合成吸着剤や、セファデックスLH-20（ファルマシア社製）等のゲル過剤を用いたカラムクロマトグラフィー、あるいは高速液体クロマトグラフィー；さらにシリカゲル等を担体とした分取薄層クロマトグラフィー等が有効である。

【0025】<3> 本発明のジテブシドの製造法

本発明のジテブシドの製造法は、不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌D2949株（以下、「D2949」と略記することがある）を用いることを特徴とする。このD2949株は、本発明者らにより双子葉植物体上より新たに分離された真菌類の一一種であり、その菌学的性状は次の通りである。

【0026】① D2949株の形態学的性状

ボテトデキストロース寒天（PDA）、麦芽寒天（MA）、オートミール寒天（OA）、及び三浦培地（LCA）上、27°Cで生育は中程度であり、1週間の培養でコロニーの径は5~6 cmとなり、その形態は平たんでピロード状である。コロニーは、灰緑色～暗灰緑色を呈し、裏面は灰緑色～暗褐色を呈する。基底菌糸は分岐し、多数の隔壁を有し、巾は3~1 μmに至り、褐色を呈する。気生菌糸の発達は豊富であり、菌糸は分岐し隔壁を有する。

【0027】培養2週間後に、培地表面に密に集合した分生子柄（分生子柄束）を形成し、分生子柄束は、高さ10 mmに達し、巾は25~73 μmに至る。分生子柄束形成菌（Synnematous fungi）の場合、通常分生子柄束の先端あるいは側面に分生子形成が見られるが、D2949株では、どの培地で培養した場合にも分生子等の特徴的な形態は観察できなかった。

② 生育温度（PDA上、1週間培養）：15~30°C  
(最適温度27°C)

③ 生育pH（LCA上、1週間培養）：3~9（最適生育pH 6~7）

【0028】以上の性質から、D2949株を不完全糸状菌綱に属する分生子柄束形成菌D2949株と称呼することにした。なおD2949株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM P-14711の受託番号で寄託されている。

【0029】本発明においては、前記の菌を通常の微生物が利用し得る栄養物を含有する培地で培養する。栄養源としてはグルコース、水飴、デキストリン、シュクロース、デンプン、糖蜜及び動・植物油等を使用できる。

また窒素源として大豆粉、小麦胚芽、コーンスティーブ・リカ、綿実粕、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、硫酸アンモニウム、硝酸ソーダ及び尿素等を使用できる。その他必要に応じて、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、コバルト、塩素、リン酸、硫酸及びその他のイオンを生成することの出来る無機塩類を培地に添加することは有効である。また菌の生育を助け、本ジテブシドの生産を促進するような有機及び無機物を適当に培地に添加することができる。

10 【0030】培養法としては、好気的条件での培養法、特に固体培養法や深部培養法が適している。培養に適当な温度は15~30°Cであるが、より好ましくは20~27°C付近で培養する。ジテブシドの生産は培地や培養条件により異なるが、固体培養、振とう培養、タンク培養のいずれにおいても通常2~14日間でその蓄積が最高に達する。培養中のジテブシドの蓄積量が最高になった時に培養を停止し、培養液から目的物質を単離精製する。

【0031】本発明に用いるジテブシドは、後記実施例20に示すように低濃度でP13キナーゼ阻害活性を有することから、これを含有するP13キナーゼ阻害剤は有効な抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗動脈硬化剤等として利用できることが期待される。

【0032】

【実施例】以下に本発明の実施例を示すが、ジテブシドの性状に基づきその製造法を種々考案することができる。

【0033】従って本発明は、本実施例に限定されるものではなく、実施例に示すジテブシドの修飾手段は勿論、

30 ジテブシドの性状に基づいて公知の手段を施して生産、濃縮、抽出、精製されたジテブシドを有効成分とするP13キナーゼ阻害剤は、すべて本発明に包含される。

【0034】実施例1

<1> D2949株の培養

水アメ40 g、大豆油3 g、ソルビー（日清製油社製、粉末状大豆蛋白の商標）20 g、ファーマメディア（トレダス社製、綿実粕の商標）10 g、サングレイン（サングロス社製、可溶性植物蛋白の商標）5 g、CaCO<sub>3</sub> 3 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10 mg、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 mg、NiCl<sub>2</sub> 10 mgと水道水1 Lを含有する培地（pH 6.0）を40 mlずつ200 ml

三角フラスコ20本に分注し、121°Cで20分間オートクレーブ滅菌した。この種培養用培地にD2949株を1白金耳づつ植菌し、27°Cで4日間、210回転にて振とう培養した。

【0035】別にマルトース80 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 4.2 g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1 g、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 1 g、FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mg、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 3.2 mg、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0.3 mg、MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 mg、(N

$\text{H}_4\text{N}^+ \text{MoO}_4^- \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.2 mgと脱塩水1Lを含有するゲッティンゲン大学培地(pH 6.0)を40mLずつ、200mL三角フラスコ20本に分注し、12°C、20分間オートクレーブ滅菌した。

【0036】この主発酵培地に前記種培養液を4mLずつ接種し、27°Cにおいて7日間、210回転にて振とう培養した。

【0037】<2>培養により製造したジデブシドの精製

上記で得られた培養液にフラスコ1本当たり40mLのアセトンを添加し、攪拌抽出して1.4Lのアセトン水溶液を得た。

【0038】減圧下、溶媒を留去した後、水500mLと酢酸エチル500mLを加え、水層を塩酸でpH2に調整して抽出した。酢酸エチル層を分取し、溶媒を減圧留去して7.2g残渣を得た。これを蒸留水に懸濁し、オクタデシルシリカゲル(MCI GEL ODS 1M Y)50gを充填したカラム上にチャージした。カラムをアセトニトリル-水混液(3:2)250mLで洗った後、アセトニトリル-水混液(4:1)250mLで溶出した画分を減圧下で濃縮し、840mgの粗ジデブシドを得た。

【0039】上記で得られた粗ジデブシド109mgを、分取シリカゲルTLCプレート(MERCK社、PSC-Fertigplatten Kieselgel 60F<sub>254</sub>, 20×20cm, Schichtdicke(層厚)2mm)6枚を用いて、展開溶媒としてクロロホルム-イソプロパノール-水-酢酸混液(100:40:5:1)を用いて3回展開することにより分離した。

【0040】ジデブシドはRf 0.45(ジデブシド1)とRf 0.30(ジデブシド2)に分離されたので、各画分をTLCプレートからかきとて展開溶媒で溶出した。

【0041】それぞれ溶媒を留去後、アセトニトリル-水混液(1:4)に懸濁し、オクタデシルシリカゲルカラム(Waters社、Sep-Pak Cartidge)にチャージして、同混液5mLで洗浄後、アセトニトリル-水混液(4:1)5mLで溶出して、溶出液から溶媒を留去し、ジデブシド1 56.8mg、ジデブシド2 45.3mgを得た。

【0042】<3>化学的修飾によるジデブシドの製造上記<2>で得られたジデブシド1 41.0mgを、5%HC1を含むメタノール中、室温22時間反応させた後、溶媒を減圧下で留去した。残渣を少量のクロロホルムに溶かし、あらかじめクロロホルム:メタノール:酢酸混液(200:4:1)で充填したシリカゲルカラム(シリカゲル5g)にチャージし、同混液で展開して6.3mgの粗ジデブシド3を得た。これをn-ヘキサン中で粉末にし、3.6mgのジデブシド3を得た。

【0043】<4>ジデブシドの構造決定

(1) ジデブシド1の構造

こうして精製されたジデブシド1は、下記の理化学的性質より構造解析をした結果、前記一般式(1)中、Rが $\beta$ -D-グルコピラノシリル基であるTP1-1であると同定された。

【0044】1)・陽イオン SIマススペクトル: 671 ([M+Na]<sup>+</sup>)

・陰イオン SIマススペクトル: 647 ([M-H]<sup>-</sup>)

10) 2) UVスペクトル(メタノール中)  $\lambda_{\max}$  (nm): 253

3) <sup>1</sup>H-NMR(重メタノール中, 500MHz)  $\delta$  (ppm):

0.88(3H, t, J=6.8Hz), 0.90(3H, t, J=6.7Hz),  
1.29(16H, m), 1.61(4H, m), 2.66(2H, m),  
2.97(2H, t, J=7.6Hz), 3.4~3.5(4H, m),  
3.72(1H, dd, J=5.0Hz, 12.2Hz), 3.90(1H, d, J=12.2Hz),  
4.93(1H, d, J=6.9Hz), 6.43(1H, d, J=2.5Hz),  
6.59(1H, d, J=2.5Hz), 6.62(1H, d, J=2.3Hz),  
6.69(1H, d, J=2.3Hz)

【0045】4) <sup>13</sup>C-NMR(重メタノール中, 125MHz) (ppm):

14.4(q), 14.4(q), 23.7(t), 23.7(t), 30.3(t),  
30.3(t), 30.6(t), 30.8(t), 32.7(t), 33.0(t),  
33.0(t), 33.0(t), 34.9(t), 36.8(t), 62.6(t),  
71.3(d), 75.0(d), 78.1(d), 78.3(d), 102.4(d),  
103.1(d), 108.9(d), 111.8(d), 113.9(s), 115.9(s),  
116.0(d), 145.0(s), 149.0(s), 155.4(s), 158.1(s),  
161.6(s), 164.0(s), 168.1(s), 174.2(s)

30) 【0046】上記物理化学的データはTP1-1の文献値(特公平5-1777号公報)と一致した。

【0047】(2) ジデブシド2の構造

前記のようにして精製されたジデブシド2は、下記の理化学的性質より構造解析をした結果、前記一般式(1)中、Rが $\beta$ -D-ガラクトピラノシリル基であるTP1-2であると同定された。

【0048】1)・陽イオン SIマススペクトル: 671 ([M+Na]<sup>+</sup>)

・陰イオン SIマススペクトル: 647 ([M-H]<sup>-</sup>)

40) 2) UVスペクトル(メタノール中)  $\lambda_{\max}$  (nm): 253

3) <sup>1</sup>H-NMR(重メタノール中, 500MHz)  $\delta$  (ppm):

0.87(3H, t, J=6.9Hz), 0.89(3H, t, J=6.8Hz),  
1.28(16H, m), 1.61(4H, m), 2.67(2H, m),  
2.96(2H, t, J=7.8Hz), 3.58(1H, dd, J=3.0Hz, 9.8Hz),  
3.68(1H, dd, J=6.0Hz, 6.0Hz),  
3.75(1H, dd, J=5.2Hz, 11.2Hz),  
3.81(2H, m), 3.89(1H, d, J=3.5Hz),

4.87(1H,d,J=7.8Hz), 6.41(1H,d,J=1.9Hz),  
 6.59(1H,d,J=1.9Hz), 6.63(1H,d,J=2.3Hz),  
 6.70(1H,d,J=2.3Hz)  
 【0049】4)  $^{13}\text{C}$ -NMR (重メタノール中、125MHz) (ppm) :  
 14.4(q), 14.4(q), 23.7(t), 23.7(t), 30.3(t),  
 30.3(t), 30.6(t), 30.9(t), 32.7(t), 33.0(t),  
 33.0(t), 33.1(t), 34.9(t), 36.8(t), 62.4(t),  
 70.2(d), 72.4(d), 75.0(d), 77.2(d), 102.4(d),  
 103.8(d), 109.0(d), 111.7(d), 114.1(s), 115.8(s),  
 116.0(d), 144.9(s), 149.0(s), 155.3(s), 158.3(s),  
 161.5(s), 164.0(s), 168.1(s), 174.3(s)

【0050】上記物理化学的データはTP I-2の文献値(特公平5-1777号公報)と一致した。

#### 【0051】(3) ジテブシド3の構造

上記のようにして精製されたジテブシド3は、下記の理化学的性質より構造解析をした結果、前記一般式(1)中 Rが水素原子であるTP I-5である同定された。

#### 【0052】

- 1) FDマススペクトル: 486 (M<sup>+</sup>)
  - 2) UVスペクトル(メタノール中)  $\lambda_{\text{max}}$  (nm) : 270, 305
  - 3)  $^1\text{H}$ -NMR(重クロロホルム中, 300MHz) :
- 0.85(3H,t,J=6.6Hz), 0.88(3H,t,J=6.6Hz),  
 1.29(16H,m), 1.65(4H,m), 2.97(4H,m),  
 6.32(1H,d,J=2.6Hz), 6.33(1H,d,J=2.6Hz),  
 6.61(1H,d,J=2.4Hz), 6.73(1H,d,J=2.4Hz),  
 11.27(1H,s)

【0053】上記物理化学的データはTP I-5の文献値(特公平5-1777号公報)と一致した。

#### 【0054】実施例2

##### ジテブシドのP I 3 キナーゼ阻害作用

実施例1で得られたジテブシドについて、P I 3 キナーゼの阻害活性を測定した。この測定はCarpenterらの方法(J. Biol. Chem., 265, 19704-19711(1990))に基づき、牛の肝臓から部分精製した\*

\* P I 3 キナーゼを用いて行なった。

【0055】すなわち、ホスファチジルイノシトール 67 μM, [ $\tau$ - $^{33}\text{P}$ ]ATP (1.0 μCi), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM NaCl, 1.0 mM EGTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 ng 牛肝臓部分精製 P I 3 キナーゼ、並びにジテブシド試料を含む反応溶液 50 ml を 37° で 20 分間インキュベートした。

【0056】500 ml のクロロホルム/メタノール/濃塩酸 (200:200:1, (V/V/V)) を加えて反応を停止させた後、125 μl の1N 塩酸を加えて混合し、遠心分離 (16,000 rpm, 10秒)により、2層に分離した。上層を除いた後、下層の溶媒を除去し、得られた反応生成物をクロロホルム 10 μl に溶解して薄層板(シルカゲル 60 F<sub>254</sub>)にスポットした。

【0057】この後、薄層板をクロロホルム/メタノール/28%アンモニウム水/水 (17.5:25:3.75:6 (V/V/V/V)) により展開した。展開後

20 の薄層板におけるホスファチジルイノシトール-3-リン酸画分をオートラジオグラフィーにより確認した。さらに、この画分を切り出してバイアル瓶に入れ、メタノール 4 ml を加えた後、ホスファチジルイノシトール-3-リン酸に取り込まれた $^{33}\text{P}$ の放射活性を、チェレンコフ効果により液体シンチレーションカウンターを用いて定量した。

【0058】その結果、TP I-1, TP I-2, TP I-5 の 50% 阻害濃度は、それぞれ 15.8, 5.6, 8.3 μM であった。この結果から明らかなように

30 本発明に用いるジテブシドは低濃度で P I 3 キナーゼ阻害活性を有する。

#### 【0059】

【発明の効果】本発明に用いるジテブシドは、低濃度で P I 3 キナーゼ阻害作用を示すので、これを含有する P I 3 キナーゼ阻害剤は抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗動脈硬化剤等として期待される。

#### フロントページの続き

(51)Int.Cl.*	識別記号	序内整理番号	F.I	技術表示箇所
C 07 H 15/203				
C 12 P 7/62				
19/44				
//(C 12 P 7/62				
C 12 R 1:645)				
(C 12 P 19/44				
C 12 R 1:645)				

(7)

特開平8-175990

(72)発明者 千葉 紀子  
神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地三  
菱化学株式会社横浜総合研究所内

(72)発明者 三川 隆  
神奈川県横浜市青葉区鶴志田町1000番地三  
菱化学株式会社横浜総合研究所内

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**